

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental (*true experiment*) dengan menggunakan metode *The Post Test Only Control Group Design*.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan selama 25 hari di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang pada bulan Juni sampai dengan bulan Juli.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan.

4.3.2 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel penelitian diambil dari populasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dan diambil menggunakan teknik *Simple Random Sampling*.

4.3.3 Besar Sampel

Perhitungan besarnya sampel pada penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus Pocock (Pocock, 2008):

$$n = \frac{2\sigma^2}{(\mu_2 - \mu_1)^2} \times f(\alpha, \beta)$$

Keterangan:

n = Jumlah sampel

σ = Simpang baku

μ_2 = Rerata hasil pada kelompok perlakuan

μ_1 = Rerata hasil pada kelompok kontrol

$f(\alpha, \beta)$ = Sesuai dengan table Pocock

Pada penelitian yang sudah dilakukan oleh Usoh *et al.* (2009) tentang efek antioksidan ekstrak bunga kering rosela terhadap stress oksidatif, di dapatkan data sebagai berikut:

σ = 9,05

μ_2 = 86,53

μ_1 = 102,60

α = 0.01

β = 0.05

Mengacu pada tabel Pocock akhirnya didapatkan nilai data $f(\alpha, \beta)$ sebesar 6,6. Untuk mendapatkan jumlah sampel tiap kelompok, (n) maka angka yang diperoleh tersebut di atas dimasukkan ke dalam rumus:

$$n = \frac{2 \times 9,05^2}{(86,53 - 102,60)^2} \times 6,6$$

$$n = \frac{2 \times 81,90}{163,80} \times 6,6 (-16,07)^2$$

$$n = \frac{163,80}{258,24} \times 6,6$$

$$n = 0,69 \times 6,6$$

$$n = 4,554$$

didapatkan hasil $n = 4,554$, dibulatkan ke atas menjadi 5. Untuk mengantisipasi kemungkinan sampel terpilih yang *drop out*, maka perlu dilakukan koreksi terhadap besar sampel, yang dihitung dengan rumus:

$$N1 = N / (1-f)$$

$$N1 = 5 / (1-0,1)$$

$$N1 = 5 / 0,9$$

$$N1 = 5,56$$

$$N1 = 6 \text{ (Hidayat, 2007)}$$

Keterangan:

N = besar sampel yang dihitung

f = perkiraan proporsi drop out sebesar 10 % ($f = 0,1$)

Keseluruhan tikus akan dibagi menjadi 5 kelompok dan tiap kelompok terdiri atas 6 ekor tikus (5 ekor tikus sebagai replikasi perlakuan, 1 ekor tikus sebagai cadangan). Jadi jumlah sampel keseluruhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor tikus. Dari 5 kelompok dibagi menjadi dua kelompok kontrol perlakuan dan tiga kelompok perlakuan:

- a. Kelompok 1: Kontrol negatif (diberi pakan standar tanpa pemaparan minyak kelapa sawit pemanasan berulang dan pemberian ekstrak buah naga merah).
- b. Kelompok 2: Kontrol positif (Pemberian paparan minyak kelapa sawit pemanasan berulang tanpa pemberian ekstrak buah naga merah).
- c. Kelompok 3: Pemberian paparan minyak kelapa sawit pemanasan berulang dan ekstrak buah naga merah Dosis 1.

- d. Kelompok 4: Pemberian paparan minyak kelapa sawit pemanasan berulang dan buah naga merah dosis 2.
- e. Kelompok 5: Pemberian paparan minyak kelapa sawit pemanasan berulang dan buah naga merah dosis 3.

4.3.4 Karakteristik Sampel Penelitian

a. Kriteria Inklusi

- 1. Umur 2-3 bulan
- 2. Berat badan 150 – 250 gram
- 3. Jantan
- 4. Sehat, ditandai dengan gerakan yang aktif, mata jernih dan bulu yang tebal.

b. Kriteria Eksklusi

- 1. Tikus yang sakit/cacat yang dapat mengganggu aktifitas fisik tikus secara permanen selama adaptasi
- 2. Tikus yang mati selama adaptasi

c. Kriteria Drop Out

- 1. Tikus sakit/cacat yang dapat mengganggu aktifitas fisik tikus secara permanen selama penelitian
- 2. Tikus yang mati selama penelitian

4.3.5 Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak buah naga merah.

b. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar MDA (Malondialdehid) tikus putih.



4.3.6 Definisi Operasional Penelitian

No	Variabel	Definisi Operasional	Cara	Alat	Hasil	Skala
1	Ekstrak buah naga merah	Dosis ekstrak buah naga merah yang akan digunakan terbagi 3 dosis, dosis 1 30 mg/200gram, dosis 2 60 mg/200gram, dosis 3 120 mg/200gram. Ekstrak buah naga merah dibuat dari seluruh bagian dari buah naga merah itu sendiri.	-	-	-	-
2	Dosis ekstrak buah naga merah	Dosis yang ditentukan dari peneliti sebelumnya yang telah terbagi menjadi tiga dosis.	-	-	Dosis 1 : 30 mg/200gram Dosis 2 : 60 mg/200gram, Dosis 3 : 120 mg/200gram	Numerik
3	Minyak Kelapa sawit	Minyak kelapa sawit dalam penelitian menggunakan minyak kelapa sawit “x” yang dipanaskan pada suhu 180°C	-	-	0,42ml/200 gram berat badan tikus perhari	Numerik

		<p>dengan cara pengukuran derajat suhu pada minyak menggunakan termometer digital yang biasa digunakan untuk mengukur suhu oven manual. Minyak kelapa sawit yg telah bersuhu 180°C digunakan untuk menggoreng kentang sebanyak 5 kali dan setiap kalinya 10 menit. Setelah dipanaskan selama 10 menit, minyak didinginkan selama 5 jam pada suhu ruangan, baru dilanjutkan penggorengan, selanjutnya pemberian dosis minyak kelapa sawit adalah sebanyak 0,42ml/200 gram berat badan tikus perhari melalui sonde modifikasi. Paparan minyak kelapa sawit dengan pemanasan berulang dilakukan selama 14 hari. Untuk keseragaman,</p>				
--	--	---	--	--	--	--

		maka pemberian minyak kelapa sawit pemanasan berulang dilakukan pukul 12.00 atau 1 jam sebelum pemberian ekstrak buah naga merah.				
4	Kadar Malondialdehid (MDA)	MDA merupakan produk akhir peroksida lipid, dan bisa digunakan sebagai petanda (biomarker) terjadinya kenaikan radikal bebas.	Menggunakan metode TBARSC (<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substance Concentration</i>)	Spektrometri	Satuan dalam mmol/l.	Numerik

4.4 Alat dan Bahan

4.4.1 Alat dan Bahan Penelitian

a. Alat Pemeliharaan Tikus

1. Kandang tikus
2. Penutup kandang dari anyaman kawat
3. Botol air
4. Tempat makan tikus
5. Timbangan

b. Alat Pembedah Tikus

1. *Scalpel*
2. Pinset
3. Gunting
4. Jarum
5. Meja lilin

c. Alat pengukuran kadar MDA

1. Tabung sentrifuge 14cc
2. Mesin sentrifuge
3. Timbangan analitik
4. Ujung pipet (*yellow and blue tips*)
5. Inkubator
6. Kertas saring
7. *Water batch*
8. Spektrofometer

d. Alat Pemanas Minyak Kelapa Sawit

1. Kompor
2. Panci
3. Termometer

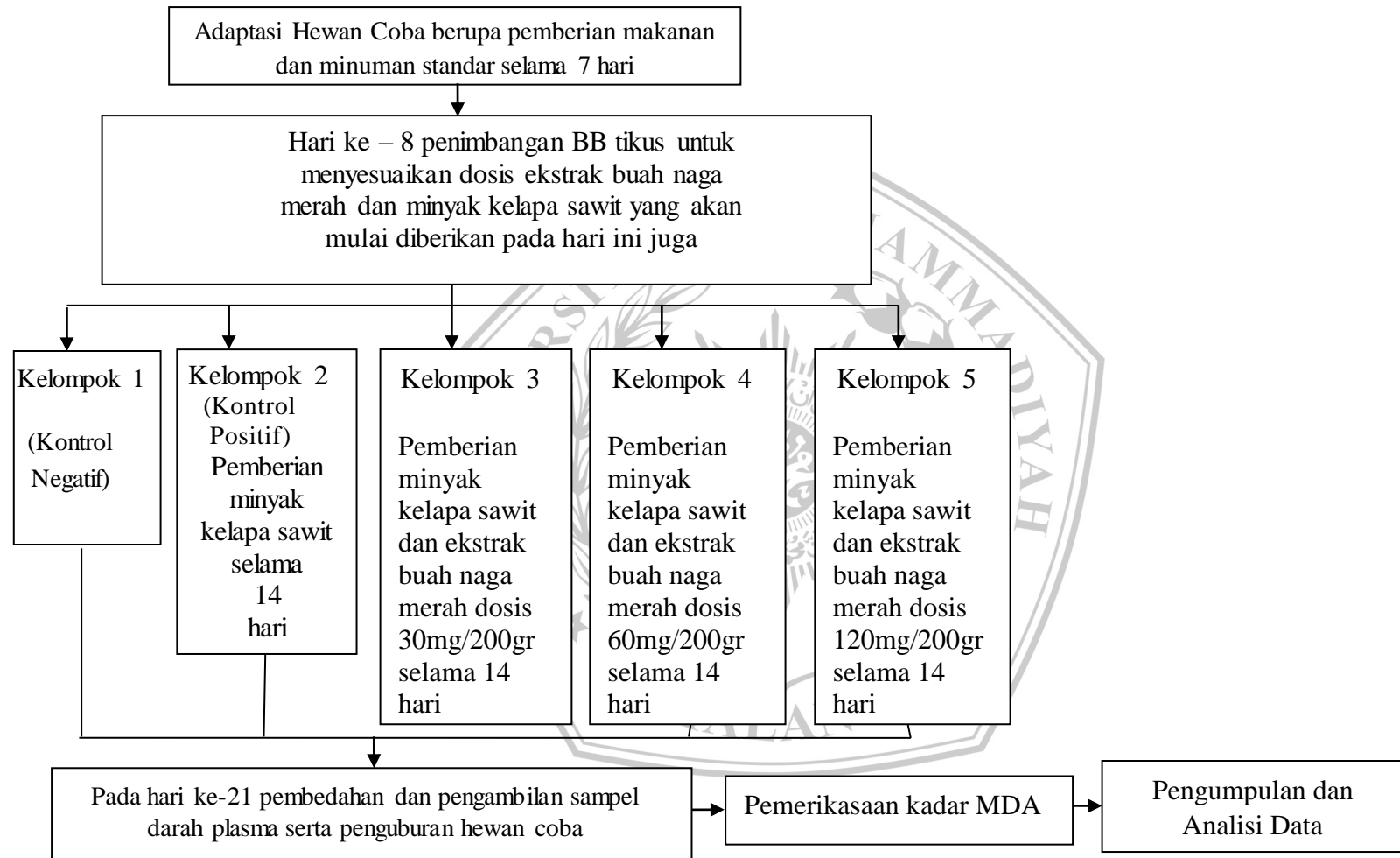
e. Alat Lain

1. Sonde
2. Mikrometer square
3. Sduit injeksi 3 ml

4.4.2 Bahan Penelitian

- a. Ekstrak buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*)
- b. Etanol
- c. Minyak kelapa sawit
- d. Bahan Pengukuran MDA: *Aqudest*, EDTA, *xanthin*, *xanthineoksidase* NBT, NA *thiobikarbonat*, Hcl, *Trichlorida etil acid* (TCA), Spektrofotometer UV, *Buffer phosfatsolution*.

4.5 Alur Penelitian



4.5.1 Adaptasi hewan percobaan

Tikus diaklimatisasi terlebih dahulu dengan lingkungan dan makanan selama satu minggu di laboratorium sebelum dipapar minyak kelapa sawit pemanasan berulang sambil diamati kesehatannya.

4.5.2 Pemberian ekstrak buah naga merah

Dosis terapi ekstrak buah naga merah yang paling berpengaruh adalah 60mg ekstrak buah naga merah dengan pelarut etanol 96%, dosis ini berdasarkan penelitian sebelumnya yang digunakan untuk memperbaiki profil lipid pada tikus putih wistar jantan (Indriasari, 2012). Sehingga perhitungannya adalah 60 mg/200gram berat badan tikus sebagai nilai tengah (n). Pemberian dosis ini didasarkan pada deret 1/2n, n, dan 2n.

Dosis 1: $\frac{1}{2} \times (n) = \frac{1}{2} \times 60 \text{ mg} = 30 \text{ mg/200gram}$ berat badan tikus

Dosis 2: $(n) = 60 \text{ mg/200gram}$ berat badan tikus

Dosis 3: $2 \times (n) = 2 \times 60 \text{ mg} = 120 \text{ mg/200gram}$ berat badan tikus

Pemberian ekstrak buah naga merah diberikan selama 14 hari melalui sonde modifikasi, dibuat dari spuit 3 ml yang kemudian dihubungkan dengan pipa karet dengan diameter 4 mm dan panjang 7 cm. Untuk keseragaman maka pemberian buah naga merah dilakukan setiap pukul 13.00 WIB selama 14 hari (Indriasari, 2012).

4.5.3 Pemberian Minyak Kelapa Sawit

Dosis minyak goreng dari kelapa sawit *deep frying* yang diberikan pada mencit sehingga dapat menyebabkan kerusakan hati adalah 0,3 ml/100gram berat badan atau 0,06 ml/20gram berat badan mencit. Faktor konversi (20 gram) ke tikus (200 gram) adalah 7,0. Maka dosis minyak kelapa sawit pemanasan berulang dalam penelitian ini adalah: $0,06 \times 7,0 = 0,42 \text{ ml/200gram}$ berat badan

tikus/hari melalui sonde modifikasi (Maulida, 2010). Untuk keseragaman maka pemberian minyak kelapa sawit pemanasan berulang dilakukan pukul 12.00 WIB atau 1 jam sebelum pemberian ekstrak buah naga merah dan diberikan selama 14 hari berturut - turut. Konversi dapat dilihat pada table 4.1:

Tabel 4.1 Konversi Dosis antar Spesies

	Mencit 20gr	Tikus 200gr	Marmot 400gr	Kelinci 1,5kg	Kucing 2kg	Kera 4kg	Anjing 12kg	Manusia 70kg
Mencit 20gr	1	7	12.25	27.8	29.7	64.1	124.2	387.9
Tikus 200gr	0.14	1	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56
Marmot 400gr	0.08	0.57	1	2.25	2.4	5.2	10.2	31.5
Kelinci 1,5kg	0.04	0.25	0.44	1	1.08	2.4	4.5	14.2
Kucing 2kg	0.03	0.23	0.41	0.92	1	2.2	4.1	13
Kera 4kg	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1	1.9	6.1
Anjing 12kg	0.008	0.06	0.1	0.22	0.24	0.52	1	3.1
Manusia 70kg	0.0026	0.018	0.031	0.07	0.076	0.16	0.32	1

(Laurence, 2008)

4.5.4 Penyiapan Larutan Uji

Buah naga Merah diberikan dalam sediaan ekstrak sesuai dengan dosis masing-masing kelompok perlakuan.

4.5.5 Proses Anastesi dan Pembedahan Hewan Coba

a. Proses Anastesi

Tahap ini dilakukan dengan memasukkan hewan coba ke dalam toples kaca yang sebelumnya sudah diberi kapas yang mengandung kloroform. Pembiusan dilakukan satu persatu dengan harapan pembiusan dapat dilakukan secara inhalasi dengan dosis eter 0,67 ml/hewan coba selama 60 detik yang dihitung menggunakan *stopwatch*.

b. Proses Pembedahan

Hewan coba yang teranastesi ditandai dengan tidak adanya respon nyeri, kemudian diletakkan pada meja paraffin dan keempat kaki tikus difiksasi menggunakan jarum pentul. Kemudian tikus dibedah menggunakan gunting dari abdomen hingga setinggi leher, kemudian darah sampel diambil dari ventrikel kiri jantung sebanyak ± 3 ml. Setelah pembedahan dilakukan, tikus dijahit kembali agar tertutup bagian yang telah dibedah.

4.5.6 Proses Penguburan Hewan Coba

Bangkai tikus diletakkan dalam wadah baskom, bangkai tikus percobaan dikubur di tanah dengan kedalaman minimal 50 cm dan luas lubang 0,25 m².

Setiap lubang hanya digunakan untuk mengubur 10 tikus secara bersama, hal ini untuk mencegah bangkai tikus digali oleh hewan lain seperti kucing. Lubang ditutup kembali dengan tanah lalu lubang dipadatkan agar tidak tercium bau dari bangkai tikus tersebut.

4.6 Analisis Data

Seluruh teknis pengolahan data hasil penelitian akan dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan *Software Statistical Product and Service*

Solution 20 PS (SPSS 20) for Windows dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

Pada penelitian ini, variabel yang akan dianalisis yaitu pengaruh ekstrak buah naga merah terhadap kadar MDA pada tikus putih jantan. Untuk mengetahui apakah terdapat keragaman antar perlakuan dilakukan uji hipotesis komperatif. Metode yang dapat digunakan, yaitu uji parametrik One-way ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan alternatifnya yaitu uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*.

Metode *One-way ANOVA* dapat digunakan jika data memenuhi syarat-syarat uji parametrik sebagai berikut (Dahlan, 2004):

1. Terdapat lebih dari dua kelompok yang tidak berpasangan.
2. Distribusi data normal ($p > 0,05$), yang dapat diketahui dari uji normalitas (*Kolmogrov-Smirnov Goodness of Fit Test*). Jika distribusi data tidak normal, maka diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya distribusi data menjadi normal.
3. Ragam data sama atau homogen ($p > 0,05$), yang dapat diketahui dari uji homogenitas *Levene* (*Levene Test Homogeneity of Variance*). Jika varians data tidak sama atau homogen, maka diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya menjadi sama atau homogen.
4. Jika data hasil transformasi tidak terdistribusi normal atau ragam data tetap tidak sama, maka dipilih uji *Kruskal-Wallis* sebagai alternatifnya.

Uji *One-way ANOVA* digunakan untuk menganalisis apakah terdapat perbedaan hasil yang bermakna antar masing-masing kelompok perlakuan dengan melihat besarnya nilai signifikansi (nilai p). Bila $p < 0,05$, maka dapat disimpulkan bahwa paling tidak terdapat perbedaan hasil yang bermakna antara dua kelompok

perlakuan. Sedangkan apabila nilai $p > 0,05$, maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan hasil yang bermakna antar masing-masing kelompok perlakuan (Dahlan, 2004).

Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna dilakukan uji *Post-Hoc* dengan menggunakan uji *Tukey HSD* untuk data yang menggunakan uji *One-way ANOVA* dan uji *Post-Hoc Tukey*. Perbedaan antar kelompok dikatakan bermakna apabila didapatkan nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) (Dahlan, 2004).

Untuk mengetahui seberapa kuat korelasi antara pemberian beberapa ekstrak kulit buah naga merah terhadap kadar MDA tikus putih jantan, dilakukan uji korelasi *Pearson* dengan alternatif berupa uji korelasi *Spearman* jika syarat uji parametrik berupa distribusi sampel normal, sampel diambil secara random yang mewakili populasi dan skala data harus kontinu (rasio/interval) tidak terpenuhi. Dari uji korelasi, dapat diketahui besarnya perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara bermakna, yang telah diketahui sebelumnya dari hasil uji *Post-Hoc Tukey HSD*. Interpretasi hasil uji korelasi didasarkan pada nilai p , kekuatan korelasi (r), dan arah korelasi (Dahlan, 2004).

Selanjutnya dilakukan uji regresi linear, yang digunakan dengan tujuan untuk mengetahui dosis ekstrak buah naga merah mana yang paling berpengaruh terhadap kadar MDA pada tikus putih jantan.